

MARIANA SCHENATO ARAUJO

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE *glnZ* DE
*Azospirillum brasilense***

Monografia apresentada para obtenção do
título de Bacharel no Curso de Ciências
Biológicas, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.

CURITIBA

2000

ORIENTADORA

Dra. Leda Satie Chubatsu

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Prof^a. Dra. Leda Satie Chubatsu pela sua orientação, ensinamentos, apoio, confiança e compreensão, fundamentais para o bom transcorrer desta monografia e para minha formação.

Agradeço ao Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa pela oportunidade de trabalho no Núcleo de Fixação de Nitrogênio e pela chance do desenvolvimento desta monografia neste laboratório.

Aos meus amigos Lilian, Rose Adele, Luíza e Luciano pela amizade, carinho, risadas, ajuda e dedicação demonstrados.

A todos os demais colegas de laboratório, meu agradecimento pela prestatividade e amizade mostrados.

Às minhas grandes amigas Ana Paula, Fernanda, Luciana e Carolina que sempre me apoiaram, incentivaram e torceram por mim.

Em especial, quero agradecer minha família que foi fundamental em todos os momentos, me ajudou, me deu amor e muita compreensão.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURASiv

RESUMO.....v

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Azospirillum brasilense*.....1

1.2 Fixação biológica de nitrogênio.....1

1.3 Genes *nif*.....2

1.4 Assimilação de Nitrogênio.....3

1.5 Sistema *ntr*.....3

2. OBJETIVOS.....8

3. METODOLOGIA

3.1 Bactérias e plasmídeos.....9

3.2 Meios de cultura.....10

3.3 Condições de cultivo e Estoque bacteriano.....11

3.4 Antibióticos11

3.5 Purificação de DNA total de *Azospirillum brasilense*.....12

3.6. Síntese de oligonucleotídeos e amplificação do DNA por PCR.....12

3.7. Clivagem do DNA amplificado por PCR com enzimas de restrição.....13

3.8. Preparo dos vetores para clonagem do produto de PCR.....14

 3.8.1. Extração dos vetores.....14

 3.8.2. Clivagem dos vetores com enzimas de restrição.....14

 3.8.3. Desfoforilação dos vetores.....15

3.9. Ligação vetor-fragmento de DNA.....15

3.10. Transformação bacteriana.....	16
3.10.1. Preparo de bactérias <i>E. coli</i> eletrocompetentes para eletroporação.....	16
3.10.2. Transformação bacteriana.....	16
3.11. Purificação e análise dos plasmídeos recombinantes.....	17
3.12. Sequenciamento de DNA.....	17
3.12.1. Purificação dos plasmídeos para sequenciamento.....	17
3.12.2. Reação de sequenciamento.....	17
3.12.3. Tratamento da amostra após reação de sequenciamento.....	18
3.12.4. Análise da sequência de DNA.....	18
3.13. Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	18
3.14. Eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes.....	19
3.15. Expressão da proteína GlnZ em <i>E. coli</i>	19
3.16. Dosagem de proteínas pelo método de Bradford.....	20

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese de oligonucleotídeos específicos para o gene <i>glnZ</i> de <i>Azospirillum brasilense</i>	21
4.2. Amplificação do fragmento via PCR.....	22
4.3. Construção de plasmídeos recombinantes com o gene <i>glnZ</i> de <i>A. brasilense</i>	22
4.3.1. Construção do plasmídeo recombinante pMSA-L1.....	22
4.3.2. Construção do plasmídeo recombinante pMSA-2.....	23
4.4. Sequenciamento dos insertos dos plasmídeos recombinantes pMSA-L1 e pMSA-2.....	23
4.5. Expressão da proteína GlnZ de <i>A. brasilense</i> em <i>E. coli</i>	24
4.5.1. Expressão da proteína GlnZ de <i>A. brasilense</i> em <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS.....	24

4.5.2. Expressão da proteína GlnZ de <i>A. brasilense</i> em <i>E. coli</i> RB9065(DE3).....	26
--	----

5. CONCLUSÕES.....	36
--------------------	----

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
------------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Controle do metabolismo geral de nitrogênio pelo sistema <i>ntr</i> em <i>Azospirillum brasilense</i>	7
Figura 2 – Produto de amplificação obtido do DNA genômico de <i>A. brasilense</i>	27
Figura 3 – Esquema do vetor de expressão pT7-7.....	28
Figura 4 – Análise do plasmídeo recombinante pMSA-L1.....	29
Figura 5 – Esquema do vetor pTZ19R.....	30
Figura 6 – Análise do plasmídeo recombinantes pMSA-2.....	31
Figura 7 – Comparação entre a sequência obtida do inserto presente nos plasmídeos recombinantes com a sequência do gene <i>glnZ</i> depositada no banco de dados GenBank.....	32
Figura 8 – Teste de solubilidade da proteína GlnZ de <i>A. brasilense</i> em <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS.....	33
Figura 9 – Expressão da proteína GlnZ de <i>A. brasilense</i> em <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS a partir do plasmídeo recombinante pMSA-L1 – condições de indução.....	34
Figura 10 – Expressão da proteína GlnZ de <i>A. brasilense</i> em <i>E. coli</i> RB9065(DE3) a partir do plasmídeo recombinante pMSA-L1.....	35

RESUMO

O nitrogênio é um elemento essencial para todos os organismos. As plantas são incapazes de assimilar o nitrogênio atmosférico mas podem metabolizar amônia. *Azospirillum brasilense* é uma bactéria fixadora de nitrogênio encontrada em associação com a raiz de diversas plantas de interesse agrícola como milho, trigo, sorgo e arroz. O processo da fixação biológica do nitrogênio, caracterizado pela redução do dinitrogênio atmosférico a amônia, é altamente regulado tanto a nível da síntese quanto da atividade do complexo enzimático. Uma das proteínas envolvidas na cascata de regulação da fixação de nitrogênio é a PII ou GlnB, produto do gene *glnB*. A proteína GlnZ ou PZ, produto do gene *glnZ*, é uma paráloga de PII; PII e GlnZ possuem alta similaridade (66% identidade e 92% similaridade) porém funções celulares distintas. A fim de caracterizar a proteína PZ, o gene *glnZ* foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico de *Azospirillum brasilense* e oligonucleotídeos sintetizados a partir da seqüência do gene depositada no banco de dados GenBank. O fragmento amplificado foi clonado no vetor de expressão pT7-7, resultando no plasmídeo recombinante pMSA-L1, e no vetor pTZ19R, originando o plasmídeo recombinante pMSA-2. O inserto presente nos dois vetores foi sequenciado e apresentou 100% de identidade com o gene *glnZ* de *A. brasilense* depositado no banco de dados. Testes de solubilidade foram realizados com a proteína GlnZ que encontrou-se tanto na fração solúvel quanto na insolúvel do extrato celular das bactérias transformadas com o plasmídeo pMSA-L1. Após indução com lactose ou IPTG, a proteína GlnZ de *A. brasilense* foi superexpressa na sua forma nativa em *E. coli* estirpes BL21(DE3)pLysS e RB9065(DE3).

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Azospirillum brasilense*

O nitrogênio é um nutriente essencial para o crescimento e sobrevivência de todos os organismos. As plantas são incapazes de metabolizar o nitrogênio atmosférico (N_2), mas podem assimilar amônia. Várias espécies de microrganismos (diazotrofos) são capazes de metabolizar o dinitrogênio atmosférico, através de sua redução a amônia, num processo denominado fixação biológica de nitrogênio.

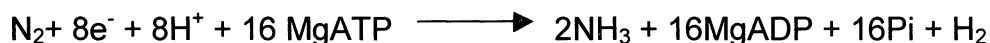
Dentre os microrganismos capazes de fixar o nitrogênio atmosférico encontra-se o *Azospirillum brasilense* que é uma bactéria Gram-negativa, curva, móvel, com um único flagelo polar e que fixa nitrogênio em condições microaeróbias. Estas bactérias são de vida livre ou podem associar-se com diversas plantas de interesse agrícola como milho, trigo, sorgo e arroz (Döbereiner e Day, 1976; Döbereiner e Pedrosa, 1987; Döbereiner, 1991). *Azospirillum* faz parte da subclasse α das Proteobactérias (Young, 1992).

Vários estudos indicam que a inoculação destas bactérias em plantas pode ter efeitos benéficos sobre sua fisiologia e produtividade. *Azospirillum brasilense* é capaz de estimular o aumento do número e do tamanho dos pêlos absorventes das raízes, o aparecimento das raízes laterais e o aumento do volume de toda a superfície radicular (Pedrosa, 1988). Como consequência, as plantas inoculadas têm maior capacidade de absorção de água e nutrientes o que leva a um crescimento vegetal mais rápido.

1.2. Fixação Biológica do Nitrogênio

A Fixação Biológica do Nitrogênio corresponde à reação de redução do dinitrogênio atmosférico (N_2) a amônia (NH_3) catalisada pelo complexo enzimático da nitrogenase. Este complexo enzimático é formado por duas metaloproteínas: a dinitrogenase redutase ou proteína-Fe e a dinitrogenase ou proteína-MoFe. Separadas

elas não são capazes de reduzir o dinitrogênio, mas juntas, na presença de ATP, molibdênio e baixas tensões de oxigênio, catalisam a reação (Postgate, 1982):



Devido ao elevado gasto energético desta reação, os diazotrofos regulam tanto a síntese da nitrogenase quanto a sua atividade em resposta a vários fatores ambientais, dentre eles, a tensão de oxigênio e a disponibilidade de nitrogênio.

O controle da expressão dos genes estruturais do complexo enzimático da nitrogenase é feita de maneira intrincada, envolvendo cascatas de genes regulatórios. De maneira simplificada, a atividade ou síntese do complexo enzimático nitrogenase só ocorre em baixos níveis de oxigênio e na ausência de amônia.

1.3. Genes *nif*

Apesar do complexo da nitrogenase possuir apenas as proteínas dinitrogenase e dinitrogenase redutase codificadas pelos genes *nifHDK*, para que o complexo seja ativo são necessários os produtos de muitos outros genes.

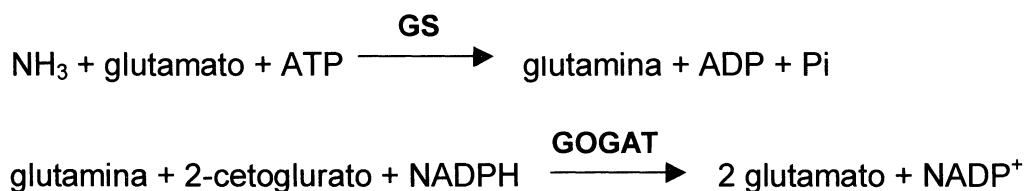
Em *Klebsiella pneumoniae*, o diazotrofo melhor estudado, existem 20 genes *nif*, genes envolvidos no processo da fixação biológica do nitrogênio, organizados em 8 operons. Destes 20 genes identificados, 14 são essenciais para a produção da nitrogenase ativa (Merrick, 1992). Neste microrganismo, o produto dos genes *nifLA* são responsáveis pela regulação da transcrição de todos os outros genes *nif*. A proteína NifA é a ativadora de transcrição enquanto que a NifL bloqueia a ativação dos genes *nif* por NifA (Merrick, 1993).

Em *Azospirillum brasilense*, o gene *nifA* faz parte do operon monocistrônico *nifA*. Não há evidência para existência de um gene homólogo ao *nifL* neste microrganismo.

1.4. Assimilação de Nitrogênio

A amônia que é obtida pelo processo da fixação do nitrogênio ou é captada do meio extracelular é assimilada na forma de glutamina e glutamato. Estes dois compostos servirão de doadores na biossíntese de outros compostos nitrogenados.

A via de assimilação de amônia mais importante em procariotos é aquela catalisada pelas enzimas GS (glutamina sintetase) e GOGAT (glutamato sintase) (Merrick e Edwards, 1992). Em baixas concentrações de nitrogênio, a amônia é assimilada na forma de glutamina que em seguida origina glutamato:



Esta via é regulada através da atividade da GS e esta enzima é controlada a nível da transcrição do seu gene (*glnA*), por regulação alostérica (através da concentração de alguns metabólitos) ou covalentemente por adenililação. A adenililação da GS, catalisada pela proteína GlnE ou Atase, provoca sua inatividade e ocorre quando os níveis de nitrogênio fixado aumentam.

Existe ainda uma outra via de assimilação de amônia em procariotos. É uma via catalisada pela enzima glutamato desidrogenase (GDH) e só ocorre quando as células crescem em uma alta concentração de nitrogênio fixado (Merrick e Edwards, 1992).

1.5. Sistema Ntr

O sistema Ntr compreende um grupo de genes cujos produtos estão envolvidos em cascatas regulatórias que controlam a expressão de genes do metabolismo nitrogenado em enterobacteriáceas. Fazem parte deste sistema o genes *glnA*, *ntrB*, *ntrC*, *glnD*, *glnE* e *glnB*.

Recentemente foi descoberto um gene similar a *glnB*, denominado *glnK* (van Heeswijk *et al.*, 1996), porém seu papel no sistema ntr não está totalmente esclarecido. Em *Klebsiella pneumoniae* e em *E. coli*, estudos mostram que a proteína GlnK pode estar agindo no complexo NifA-NifL, responsável pelo controle da atividade da fixação de nitrogênio.

O produto do gene *ntrB* (NtrB) controla a atividade do produto do gene *ntrC* (NtrC) que é um ativador de transcrição. Em condições de limitação de nitrogênio, NtrB catalisa a fosforilação da proteína NtrC, enquanto que em presença de excesso de nitrogênio, NtrB catalisa a desfosforilação de NtrC. Embora a fosforilação ou desfosforilação de NtrC seja executada por NtrB, o produto do gene *glnB* (proteína PII ou GlnB) influencia esta regulação.

Em condições de nitrogênio limitante, a proteína PII é uridililada (no seu resíduo de tirosina 51) pelo produto do gene *glnD* (uridililtransferase/ enzima removedora de uridilil ou UTase) (Son e Rhee, 1987). A proteína PII uridililada (PII-UMP) não afeta o estado de fosforilação da NtrB ou da NtrC (Atkinson *et al.*, 1994), nem se liga à NtrB. A proteína NtrB em sua forma livre catalisa a fosforilação de NtrC, que, fosforilada (NtrC-P), ativa a transcrição do operon *nifLA* em *K. pneumoniae* e *A. vinelandii* e de outros operons dependentes de NtrC.

Em condições de excesso de nitrogênio, entretanto, PII-UMP é desuridililado pela UTase (Bueno *et al.*, 1985; Merrick, 1987). A proteína PII desuridililada complexa NtrB que então catalisa a remoção do grupamento fosfato da proteína NtrC-P, inativando-a (Ninfa e Magasanik, 1986).

A proteína PII é também responsável pela modulação da atividade da adenililtransferase (produto do gene *glnE*). Em níveis baixos de amônia a proteína PII-UMP se liga à adenililtransferase estimulando a desadenilação da glutamina sintetase (GS), ativando-a. Em condições de alta amônia, a proteína PII não modificada estimula a atividade de adenililtransferase da proteína GlnE, levando a adenilação da GS e sua progressiva inativação (Stadtman *et al.*, 1970).

A relação glutamina/2-cetoglutarato sinaliza a disponibilidade de nitrogênio (NH_4^+) para a UTase (que liga glutamina) e para a proteína PII (que liga 2-cetoglutarato e ATP) (Kamberov *et al.*, 1994). Em condições limitantes de nitrogênio, os níveis de glutamina são baixos em relação aos de 2-cetoglutarato. Nestas condições, a proteína

PII está ligada a 2-cetoglutarato, apresentando uma conformação favorável a aceitar o grupamento UMP sob ação da UTase (Kamberov *et al.*, 1994). Quando os níveis de nitrogênio fixado aumentam (nível de glutamina mais elevado), a UTase se liga à glutamina e desuridilila a proteína PII (de Mel *et al.*, 1994). A UTase tem, portanto, um papel fundamental na definição da resposta celular a flutuações da concentração de amônia.

Em *Azospirillum brasilense* a proteína PII parece estar envolvida na modulação da atividade da proteína NifA que é inibida tanto por oxigênio quanto por amônia (Arsene *et al.*, 1996) (Figura 1). Mutantes de *A. brasilense*, contendo o gene *glnB* interrompido, apresentam fenótipo Nif negativo mesmo quando a proteína NifA é expressa constitutivamente (de Zamaroczy *et al.*, 1996). Quando o domínio N-terminal da proteína NifA (responsável pelo sensoreamento dos níveis de amônia) é deletado, a regulação por amônia e o requerimento da proteína PII desaparecem (Arsene *et al.*, 1996).

Em *Escherichia coli*, assim como nas outras enterobactérias, existe um gene similar a *glnB*, o gene *glnK*. Neste microrganismo tanto a PII quanto a GlnK atuam sobre a proteína NtrB necessária na regulação dos promotores Ntr e, portanto, no controle do estado de fosforilação do ativador NtrC. Além disso tanto GlnK quanto PII interagem com ATase controlando a adenililação da GS (Atkinson e Ninfa, 1998). O resíduo de tirosina 51 é conservado em GlnK e esta proteína também pode ser uridililada assim como a PII. O gene *glnK* está localizado a jusante ao gene *amtB* que codifica para um transportador de amônio (van Heeswijk *et al.*, 1996). Estes dois genes formam um operon.

O gene similar ao *glnK* em *Azospirillum brasilense* é denominado *glnZ* (de Zamaroczy *et al.*, 1996). Pouco se sabe sobre a proteína GlnZ ou PZ participando na regulação do metabolismo nitrogenado em *Azospirillum brasilense*. Mutantes *glnZ* são Nif positivos e exibem uma taxa de transporte de amônia maior em relação a estirpe selvagem, enquanto que a superexpressão deste gene resulta na queda da taxa de transporte de NH_4^+ (de Zamaroczy e Elmerich, 1997), sugerindo que *glnZ* seja um regulador negativo do transporte de amônio ou que esteja interferindo com a produção ou com o desencadeamento de sinais intracelulares para um dos sistemas de regulação da nitrogenase.

Estes resultados são distintos do mutante *glnB*, sugerindo que embora apresentem alta similaridade a nível de aminoácidos, a função de *glnZ* é diferente de *glnB*.

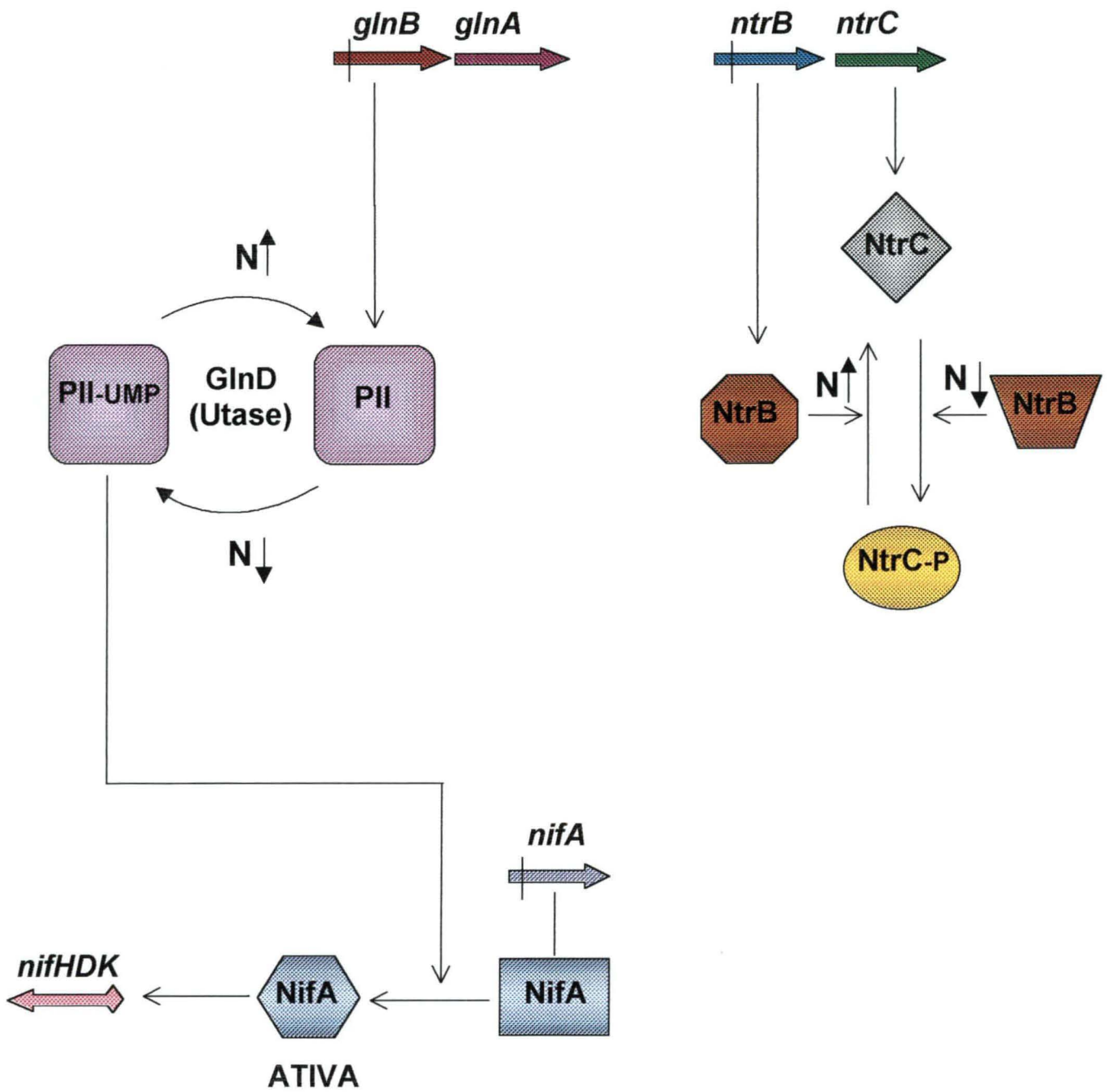


Figura 1: Controle do metabolismo geral de nitrogênio pelo sistema *ntr* em *A. brasilense*

2. OBJETIVOS

Considerando o possível papel da proteína GlnB na regulação da atividade da proteína NifA em *A. brasilense* e a similaridade estrutural entre *glnB* e *glnZ* com indicação de diferentes funções para seus produtos, e ainda, seus diferentes mecanismos de regulação da expressão de seus genes, é de grande interesse estudar a proteína GlnZ de *A. brasilense* e compará-la às proteína PII do mesmo organismo e também à de *Herbaspirillum seropedicae* cuja caracterização bioquímica e estrutural foi determinada (Benelli, *et al.* 1997).

Em vista do apresentado, os objetivos deste trabalho são a clonagem e a expressão do gene *glnZ* de *A. brasilense* em *Escherichia coli*.

3. METODOLOGIA

3.1. Bactérias e Plasmídeos

a) *Azospirillum brasilense*

FP2 (estirpe selvagem, Sp7 Nif⁺ Nal^R Sm^R)

b) *Escherichia coli*

BL21 (DE3) *pLysS* ⇒ produtora da RNA polimerase do fago T7, New England Biolabs (Sambrook *et al.*, 1989).

RB9065 (DE3) ⇒ RB9065 produtora de T7 RNA polimerase, *glnD*⁻, *glnB*⁻ (Benelli, 1997).

XL1-Blue ⇒ Sambrook *et al.*, 1989.

c) Plasmídeos

pT7-7 ⇒ vetor de expressão; New England Biolabs.

pTZ19R ⇒ Mead *et al.*, 1986.

pMSA-L1 ⇒ vetor pT7-7 contendo o gene *glnZ* de *A. brasilense*; este trabalho.

pMSA-2 ⇒ vetor pTZ19R contendo o gene *glnZ* de *A. brasilense*; este trabalho.

3.2. Meios de Cultura

Para o crescimento de *E. coli* foram utilizados os meios de cultura Luria-Broth (LB) e Terrific-Broth (TB). O meio LB apresenta a seguinte composição:

	gramas/litro
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	10,0
Triptona	10,0

A partir da adição de ágar a este meio líquido, na concentração de 15g/L, o meio de cultura sólido foi obtido e denominado LA.

O meio Terrific-Broth, TB, apresenta a seguinte composição:

	gramas/litro
Extrato de levedura	24,0
Glicerol	4,0
KH_2PO_4	2,31
K_2HPO_4	12,54

A. brasilense foi cultivado em meio NFbHP (Pedrosa e Yates, 1984) que apresenta a seguinte composição:

	gramas/litro
KH_2PO_4	4,0
K_2HPO_4	6,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-1}$
NaCl	$1,0 \cdot 10^{-1}$
CaCl_2	$2,0 \cdot 10^{-1}$
Ácido Nitrilo-triacético	$5,6 \cdot 10^{-2}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-2}$

Lactato de sódio	5,0
Biotina	$1,0 \cdot 10^{-4}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$2,35 \cdot 10^{-3}$
H_3BO_3	$2,8 \cdot 10^{-3}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	$8,0 \cdot 10^{-5}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	$2,4 \cdot 10^{-4}$

Soluções de fosfato e de cloreto de amônio (20mM) suplementaram este meio que, quando completo, apresentou pH 6,8 e foi chamado NFbHPN.

O meio NFbHP sólido possui a mesma composição porém, acrescido de 1,5% (m/v) de ágar.

3.3. Condições de Cultivo e Estoque Bacteriano

A estirpe FP2 de *A. brasilense* e as estirpes de *E coli* foram cultivadas à temperatura de 30 e 37°C, respectivamente.

No caso de culturas em meio líquido houve agitação (130 rpm) e a relação de 1/5 do volume da cultura para o volume total do frasco foi preservada a fim de manter uma boa aeração durante o crescimento.

Estoques de bactérias foram mantidos em glicerol 50% e conservados a -20° C.

3.4. Antibióticos

Os antibióticos utilizados foram:

	Solução estoque (mg/mL)	Concentração final (µg/mL)
Ácido nalidíxo (Nal)	10	10
Ampicilina (Amp)	100	200
Estreptomicina (Sm)	50	50
Canamicina (Km)	100	100

As soluções de antibióticos foram preparadas em água destilada autoclavada e esterilizadas por filtração (Millipore HAWP 0,23 μm). Todos os antibióticos foram mantidos -20°C .

3.5. Purificação do DNA total de *Azospirillum brasilense*

Cinquenta mililitros de cultura de *A. brasilense* ($\text{D.O.}_{600} \cong 2,0$), crescidos em meio NFbHPN contendo os antibióticos Sm e Nal, foram centrifugados. As células sedimentadas foram lavadas uma vez com 30 mL do tampão TES (Tris-HCl 50mmol/L pH 8,0; EDTA 20mmol/L pH 8,0; NaCl 200 mmol/L) e ressuspensas em 20 mL do mesmo.

Para romper as paredes celulares foi adicionada lisozima na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ e a mistura foi incubada a 30°C por 30 minutos. SDS (dodecilsulfato de sódio) foi adicionado 1% m/v para provocar a lise das células e a mistura voltou a ser incubada por 10 minutos a 55°C . Após esta incubação adicionou-se pronase E (200 $\mu\text{g/mL}$), e a mistura foi submetida a 50°C por 3 horas. Para a purificação final do DNA foram procedidas duas extrações com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e precipitação com 2 volumes de etanol absoluto. O precipitado obtido foi lavado com etanol 80%, seco a vácuo e dissolvido em 300 μL de TE (Tris.HCl 10 mmol/L pH 8,0; EDTA 1mmol/L pH 8,0). Após a purificação, o DNA foi submetido a análise espectrofotométrica, em comprimento de onda de 260nm e 280nm, para que sua concentração e pureza fossem determinadas. Para a concentração, foi considerada 1 unidade de absorbância em $\lambda = 260\text{nm}$ como equivalente a 50 $\mu\text{g/mL}$, e para um bom grau de pureza a relação de absorbância 260nm/280nm superior a 1,8 (Sambrook *et al*, 1989).

3.6 Síntese de oligonucleotídeos e amplificação do DNA por PCR

A amplificação do gene *glnZ* foi realizada utilizando o sistema de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Os “primers” utilizados nesta reação foram oligonucleotídeos sintetizados quimicamente (Gene Assembler da Pharmacia) a partir da sequência do gene depositada no banco de dados GenBank. Os “primers” apresentaram substituições de nucleotídeos visando a introdução de sítios de restrição na sequência desejada para facilitar a subclonagem no vetor de interesse.

Para a reação de amplificação foram utilizados tampão Gibco PCR (Tris-HCl 20mmol/L pH8,4 e KCl 50mmol/L), 0,2mmol/L de dNTPs, 10pmol de cada oligonucleotídeo, 1,5mmol/L de $MgCl_2$, 20ng de DNA de *A. brasilense* e 1U de Taq polimerase (Gibco) em um volume final de 50 μ L. Os parâmetros utilizados no termociclador para a reação de amplificação do DNA foram: 1 ciclo de 5 minutos a 96°C e 30 ciclos de 1 minuto a 96°C, 1 minuto a 50°C e 1 minuto a 72°C.

Após a amplificação a reação foi extraída com 1 volume de clorofórmio e o DNA precipitado com 2 volumes de etanol absoluto, lavado com etanol 80% e ressuspenso em 50 μ L de H_2O . Para a verificação da amplificação foram realizadas eletroforeses em gel de agarose 1,5% utilizando tampão TAE 1x (Tris-acetato 0,04mol/L e EDTA 0,001mol/L pH8,0).

3.7. Clivagem do DNA amplificado por PCR com enzimas de restrição

Os fragmentos de DNA obtidos por PCR foram digeridos com as enzimas *Bam*HI e *Nde*I utilizando 2x OPA da Pharmacia (Tris-acetato 20mmol/L pH7,5, acetato de magnésio 20mmol/L, acetato de potássio 100mmol/L) como tampão de restrição. Em um sistema de 60 μ L foram utilizados 45 μ L de fragmento de DNA amplificado, 12 μ L do tampão de restrição concentrado 10x e 0,5 μ L (5U) de cada enzima. Esta reação foi incubada por 4 horas a 37°C.

Após a incubação o DNA foi extraído com 1 volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), sendo então precipitado com 2 volumes de etanol absoluto, lavado com etanol 80% e seco a vácuo. O precipitado foi dissolvido em 25 μ L de H_2O .

3.8. Preparo dos vetores para clonagem do produto de PCR

3.8.1. Extração dos vetores

A extração dos vetores (pT7-7 e pTZ19R) de *E.coli* foi feita pelo método de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). Trinta mililitros das culturas crescidas em meio Luria Broth (LB) durante a noite foram centrifugados. Os sedimentos de células foram ressuspensos em 2,5mL de GET (glicose 50mmol/L, Tris-HCl 25mmol/L pH 8,0 e EDTA 10mmol/L pH 8,0) e a lise celular efetuada com a adição vagarosa de 2mL de SDS 1% e NaOH 0,2 mol/L. DNA cromossomal e proteínas foram precipitados pela adição de 3mL de acetato de potássio 3 mols/L pH 4,8 e incubação por 10 minutos no gelo. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas. O sobrenadante foi separado e os DNA plasmidiais precipitados com adição de 5mL de isopropanol e incubação por 10 minutos a -20°C. Após esse período as misturas foram centrifugadas, os precipitados foram secos a vácuo e ressuspensos em 400 µL de água. RNase (10µg) foi adicionada e as amostras foram incubadas a 37°C por 50 minutos. As soluções sofreram uma extração com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e outra somente com clorofórmio. Após as extrações os DNA plasmidiais foram precipitados com 1mL de etanol absoluto a -20°C durante a noite. Após centrifugação, os precipitados foram lavados duas vezes com etanol 70%, secos a vácuo e ressuspensos em 200µL de água.

3.8.2 Clivagem dos vetores com enzimas de restrição

A digestão dos vetores foi feita segundo protocolo sugerido pelo fabricante. Foram utilizados 50µL de DNA plasmidial, em tampão 2x OPA da Pharmacia (Tris-acetato 20mmol/L pH7,5, acetato de magnésio 20mmol/L, acetato de potássio 100mmol/L), e 10U de cada enzima. As reações foram incubadas durante 3 horas a 37°C. As enzimas foram inativadas posteriormente a 85°C por 20 minutos.

Para clonagem do gene *glnZ* no vetor pT7-7 foram utilizadas as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* e para a clonagem no vetor pTZ19R utilizou-se somente a enzima *XbaI*.

3.8.3. Desfosforilação dos vetores

As desfosforilações (Sambrook *et al.*, 1989) foram feitas utilizando 0,7U da enzima fosfatase alcalina de bezerro (CAP), 100 μ L de DNA plasmidial digerido com as enzimas correspondentes, 35 μ L de água e 15 μ L de tampão 10x OPA da Pharmacia (Tris-acetato 100mmol/L pH7,5, acetato de magnésio 100mmol/L e de acetato de potássio 500mmol/L). As misturas foram incubadas a 37°C durante 2 horas. Após incubação foram adicionados 15 μ L de SDS10%, 3 μ L de EDTA 0,5mol/L e 1 μ L de proteinase K (20mg/mL). Essas reações foram então incubadas a 50°C por 30 minutos. Em seguida foram feitas extrações com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) (1x) e com clorofórmio:álcool isoamílico (1x). Os DNAs foram precipitados com 3 volumes de etanol absoluto, lavados com etanol 70%, secos à vácuo e dissolvidos em 50 μ L de água.

3.9. Ligação vetor- fragmento de DNA

Os vetores (pT7-7 e pTZ19R) e o inserto (gene *glnZ*), previamente preparados, foram reunidos em reações separadas numa proporção molar de 1:5 vetor:inserto. Adicionou-se aos sistemas o tampão da T4 DNA ligase 1x (50 mmol/L Tris-HCl pH 7,6; 10mmol/L MgCl₂; 1 mmol/L DTT; 0,5 mmol/L ATP e 5% PEG 8000) e 0,8 U de T4 DNA ligase. Em seguida as reações foram incubadas à 16°C durante a noite.

3.10. Transformação bacteriana por eletroporação

3.10.1. Preparo de bactérias *E. coli* eletrocompetentes para eletroporação

Quinhentos mililitros de meio líquido LB foram inoculados com 5mL de uma cultura saturada de *E. coli* (XLI Blue, BL21(DE3) ou RB9065(DE3)). A cultura foi incubada sob agitação a 37°C até atingir uma D.O₆₀₀ entre 0,5 e 1,0. Após crescimento, a cultura foi mantida no gelo durante 15 minutos e centrifugada. As células foram lavadas com 500mL (1x) e 250mL (1x) de H₂O estéril gelada, e com 10 mL de glicerol 10%. O sedimento de células foi finalmente ressuspenso em 1 mL de glicerol 10% e fracionado em amostras de 40μL. As alíquotas foram armazenadas a -70°C.

3.10.2. Transformação bacteriana

Para transformação bacteriana 1 μL da mistura da ligação inserto-vetor foi adicionado a 40 μL da suspensão de células eletrocompetentes e mantido no gelo por 1 minuto. Essas células foram transferidas para uma cubeta de eletroporação (BRL) e submetidas a um campo elétrico (4ΩK, 330μF) a fim de permitir a entrada do plasmídeo na célula. Após a eletroporação as células foram ressuspensas em 1mL de meio LB e incubadas a 37°C, sob agitação, por 1 hora. Ao término da incubação, alíquotas da suspensão foram plaqueadas em meio LA contendo o antibiótico adequado a fim de selecionar os transformantes.

A primeira estirpe escolhida para a transformação foi a XL1-Blue, pois esta estirpe é *recA*⁻ e não expressa a RNA polimerase do fago T7. As bactérias BL21 (DE3) *plysS* e RB9065(DE3) foram utilizadas para expressão da proteína de interesse uma vez que expressam a enzima RNA polimerase do fago T7 e vetores de expressão utilizados possuem o promotor desta enzima.

3.11. Purificação e análise dos plasmídeos recombinantes

A extração dos plasmídeos de *E. coli* das diferentes estirpes foi feita segundo o método de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989), conforme o item 3.8.1.

3.12. Sequenciamento de DNA

3.12.1 Purificação dos plasmídeos para sequenciamento

As bactérias contendo o plasmídeo de interesse foram crescidas em 3 mL de meio Terrific-broth com o antibiótico correspondente até uma D.O.₆₀₀ \cong 2,0, coletadas por centrifugação e ressuspensas em 100 μ L de GET. As células foram lisadas com uma solução de SDS 1% e NaOH 0,1 mol/L. Proteínas, DNA cromosomal e restos celulares foram precipitados com 180 μ L de acetato de potássio 3mol/L, pH 4,8. Após centrifugação a solução aquosa foi extraída com 100 μ L de fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico (25:24:1). O DNA foi precipitado com 1 mL de etanol absoluto, lavado com 1 mL de etanol 70%, seco à vácuo e dissolvido em 140 μ L de água. Este DNA foi incubado com RNase (concentração final de 1 μ g/mL) por 3 horas a 37°C. Foram feitas mais duas extrações com 100 μ L de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. O DNA foi precipitado (450 μ L de etanol absoluto), lavado, seco e dissolvido em aproximadamente 8 μ L de água.

3.12.2. Reação de sequenciamento

Nesta reação foram utilizados aproximadamente 0,5 μ g do DNA purificado, 2,6 μ L de tampão TACS (Tris 106 mmol/L, MgCl₂ 2,6 mmol/L e (NH₄)₂SO₄), 15 pmol do “primer” apropriado e 6,0 μ L de mistura para sequenciamento Terminator Ready Rxn Mix (Perkin-Elmer). O volume final da reação foi de 20 μ L. A reação foi feita utilizando-se um termociclador (Perkin-Elmer) e os parâmetros utilizados foram: 1 ciclo de 5

minutos a 95°C e 35 ciclos de 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 40°C e 6 minutos a 60°C.

3.12.3. Tratamento da amostra após reação de sequenciamento

Após a reação de sequenciamento, o DNA foi precipitado com 7 µL de acetato de amônio 7,5 mol/L e 100 µL de etanol absoluto, lavado com etanol 70%, dissolvido em 15 µL de TSR (Template Suppression Reagent), desnaturado (96°C por 5 minutos) e submetido a eletroforese no Sequenciador Automático de DNA da Applied Biosystems ABI-PRIZM 310 (Perkin-Elmer).

3.12.4. Análise da sequência de DNA

A análise de comparação das sequências obtidas após o sequenciamento foi feita utilizando o programa BLAST Search (GenBank/NCBI) (Altschul *et al.*, 1990).

3.13. Eletroforese de DNA em gel de agarose

As eletroforeses de DNA foram realizadas em gel de agarose horizontal conforme descrito por Sambrook (1989). O tampão utilizado foi TAE 1X (Tris-acetato 40mM e EDTA 1mM pH 8,0) e a concentração de agarose variou de 0,7 a 1,5% dependendo do tamanho do DNA a ser analisado. O DNA foi visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta após tratamento com solução de brometo de etídio (0,5 mg/mL). O perfil eletroforético foi registrado fotograficamente (Sambrook *et al.*, 1989) ou utilizando um sistema de vídeo-imagem acoplado a equipamento de impressão a seco (GDS 5000).

3.14. Eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes

As condições de eletroforese desnaturante foram aquelas descritas por Laemmli (1970). As amostras foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 12mmol/L pH 6,8; 5% glicerol; 0,4% de SDS; 2mmol/L de 2-mercaptoetanol e 0,02% de azul de bromofenol) e aquecidas a 95°C por 3 minutos. Alíquotas de volumes variados foram aplicadas em gel de acrilamida. A concentração do gel separador foi de 15% (30% de acrilamida e 0,8% de bis-acrilamida) que foi polimerizado em tampão contendo 2,5 mL de Tris-HCl 1,5 mol/L pH 8,8, 10% SDS; 50µL de persulfato de amônio 10% e 5µL de TEMED. O gel empilhador continha 4,0% de acrilamida (30% de acrilamida e 0,8% de bis-acrilamida), 3,0 mL Tris-HCl 0,5 mol/L pH 6,8; 10% SDS, 25µL de persulfato de amônio e 5µL de TEMED. As eletroforeses foram a 160V em tampão Tris 25 mmol/L pH 8,3; glicina 192 mmol/L e SDS 0,1%.

3.15. Expressão da proteína GlnZ em *E. coli*

Dez mililitros de meio LB foram inoculados com uma cultura de *E. coli* BL21 (DE3) *pLysS* ou RB9065(DE3) contendo o plasmídeo pMSA-L1, crescida durante a noite. As células foram crescidas a 37°C sob agitação constante até DO₆₀₀ aproximadamente igual a 0.5. Neste ponto foi adicionado IPTG (0,5mmol/L) ou lactose (0,5% p/v), seguido de nova incubação por cerca de 4 horas. Após esse período as células foram recuperadas por centrifugação.

Para a análise das proteínas, o sedimento de células foi ressuspenso em 400µl de tampão (100mmol/L KCl, 50mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 1mmol/L DTT e 10% glicerol e 20mg/mL de lisozima) e as células lisadas através de sonicação utilizando um sonicador (Heat System) equipado com uma micropona em 6 ciclos de 20 segundos sobre o gelo. Após a lise, a mistura foi centrifugada e as frações solúvel e insolúvel separadas.

As proteínas foram analisadas nas eletroforeses em géis de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE) segundo procedimento descrito por Laemmli (1970).

3.16. Dosagem de proteína pelo método de Bradford

Esse método colorimétrico é baseado na ligação do Coomassie Brilliant Blue G-250 com as proteínas (Bradford, 1976). A reação se completa em aproximadamente 2 minutos e permanece estável durante 1 hora. O sistema de reação continha 1mL do corante (solução de Bradford-Coomassie Brilliant Blue G-250 (100mg/L), etanol 95% e ácido fosfórico 85%) e 100µl da amostra. Essa mistura foi homogeneizada e a absorbância a 595nm determinada. A curva padrão foi feita utilizando a soro albumina bovina (BSA) como referência, preparada no mesmo tampão das proteínas a serem quantificadas. A sensibilidade desse método é de 1 a 10 µg de proteína.

4.2. Amplificação do fragmento via PCR

A partir do DNA genômico de *A. brasilense*, um fragmento foi amplificado após a reação de PCR com os oligonucleotídeos específicos para o gene *glnZ* sintetizados quimicamente. Este fragmento de aproximadamente 340 pares de base possui o tamanho esperado para o gene *glnZ* de *A. brasilense* (Figura 2).

4.3. Construção de plasmídeos recombinantes com o gene *glnZ* de *A. brasilense*

4.3.1. Construção do plasmídeo recombinante pMSA-L1

O fragmento amplificado por PCR foi devidamente digerido com as enzimas de restrição e clonado no vetor de expressão pT7-7 (Figura 3) entre os sítios *NdeI* e *BamHI*. Em seguida a bactéria *E. coli* estirpe XL1Blue foi transformada com a reação de ligação e os transformantes selecionados através da resistência ao antibiótico ampicilina (o vetor pT7-7 apresenta resistência a este antibiótico) em meio LA. Cresceram neste meio apenas as bactérias resistentes, ou seja, aquelas que receberam o vetor. Algumas colônias foram crescidas em meio LB + ampicilina e foi feita extração de seus plasmídeos conforme descrito em materiais e métodos, item 3.8.1.

Para verificar se a clonagem do gene *glnZ* realmente ocorreu, foram realizadas reações de PCR utilizando-se "primers" específicos do vetor pT7-7 e como DNA molde o vetor pT7-7 e os plasmídeos purificados a partir das bactérias resistentes. Estas reações foram analisadas em gel de agarose 1,5% TAE 1X (Figura 4).

É possível observar diferença de migração dos produtos amplificados a partir do vetor pT7-7, de aproximadamente 100pb, e do plasmídeo recombinante, com cerca de 450 pb, comprovando a presença do inserto neste último que foi denominado pMSA-L1. A análise por digestão deste plasmídeo com as enzimas *XbaI* e *HindIII* também forneceu resultados que comprovaram a presença do inserto amplificado no vetor pT7-7 (dados não apresentados).

4.3.2. Construção do plasmídeo recombinante pMSA-2

O gene *glnZ* de *A. brasilense* foi também clonado no vetor pTZ19R (Figura 5) entre os sítios de restrição *Xba*I. Bactérias *E. coli* estirpe XL1Blue foram transformadas com a ligação e selecionadas através da resistência ao antibiótico ampicilina, a marca de resistência do vetor, em meio LA. Algumas das bactérias resistentes, ou seja, aquelas que receberam o vetor, foram crescidas em meio LB + ampicilina e foi feita extração de seus plasmídeos.

Para verificar se a clonagem do gene *glnZ* no vetor pTZ19R realmente ocorreu, reações de PCR, utilizando-se os "primers" universal e reverso específicos do vetor pTZ19R, foram realizadas utilizando como "template" o vetor pTZ19R e um plasmídeo purificado a partir das bactérias resistentes. Estas reações foram analisadas em gel de agarose 1,5% TAE 1X. (Figura 6).

Uma diferença de migração entre os produtos amplificados a partir dos diferentes moldes pode ser observada. Na linha 1, o produto amplificado apresenta cerca de 100bp, tamanho correspondente ao sítio de policlonagem do vetor pTZ19R. Já na linha 2 temos a amplificação de um fragmento de aproximadamente 450bp que corresponde ao gene *glnZ* de *Azospirillum brasilense* juntamente com algumas bases do sítio de policlonagem do vetor. Este resultado indicou a clonagem do gene *glnZ* de *A. brasilense* no vetor pTZ19R originando o plasmídeo recombinante pMSA-2.

O plasmídeo recombinante pMSA-2 foi então submetido a reações de restrição com as enzimas *Eco*RI e *Sal*I. A análise dos fragmentos obtidos através da digestão com estas duas enzimas indicou novamente a clonagem do gene *glnZ* no vetor pTZ19R (dados não apresentados).

4.4. Sequenciamento dos insertos dos plasmídeos recombinantes pMSA-L1 e pMSA-2

O plasmídeo pMSA-L1 foi primeiramente sequenciado utilizando-se o "primer" *AbglnZ3'*. A sequência obtida foi submetida a comparações com o banco de dados (GenBank) utilizando-se o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997). Este programa

traduz a sequência de nucleotídeos nas seis sequências de leitura possíveis e as compara com sequências depositadas no banco de dados. A análise desta comparação demonstrou que a sequência submetida era idêntica à sequência do gene *glnZ* já depositada no banco de dados por de Zamaroczy *et al.* (1996).

O sequenciamento deste mesmo plasmídeo utilizando o “primer” *AbglnZ5'M* foi realizado e a sequência obtida também apresentou 100% de identidade com a sequência do GenBank.

O plasmídeo recombinante pMSA-2 também foi sequenciado com os “primers” universal e reverso. As duas sequências apresentaram 100% de identidade com a sequência do gene *glnZ* depositada no banco de dados por de Zamaroczy *et al.* (1996).

A sequência do inserto presente nos dois plasmídeos recombinantes e sua comparação com a sequência do gene *glnZ* de *Azospirillum brasilense* depositada no banco de dados está representada na figura 7.

4.5. Expressão da proteína GlnZ de *A. brasilense* em *E.coli*

O plasmídeo pMSA-L1 e o vetor de expressão pT7-7 foram transformados em *E. coli* estirpes BL21(DE3)*pLysS* e em RB9065 (DE3).

Em cada estirpe transformada, o plasmídeo pMSA-L1 foi submetido a vários testes para que as condições ótimas de expressão da proteína GlnZ fossem obtidas. Nestes testes foi variado o agente indutor (IPTG ou lactose) e também a densidade óptica inicial de indução ($D.O_{600}$ 0,2, 0,3 e 0,5). Após o crescimento, indução e lise celular as proteínas foram analisadas em gel de poliacrilamida (Laemmli, 1970).

4.5.1. Expressão da proteína GlnZ de *A. brasilense* em *E. coli* BL21(DE3)*pLysS*

A proteína GlnZ de *A. brasilense* foi superexpressa primeiramente na estirpe BL21(DE3)*pLysS* de *E. coli* que é uma bactéria com boa taxa de indução uma vez que possui a RNA polimerase do fago T7.

Antes de iniciar os experimentos para obter as condições ótimas de expressão da proteína GlnZ, resolvemos testar sua solubilidade. A partir de resultados do nosso

próprio laboratório (Monteiro *et al.*, 2000), expressamos a proteína GlnZ utilizando como agente indutor a lactose e induzindo por 4 horas a partir das bactérias BL21(DE3)*pLysS* transformadas com o plasmídeo recombinante pMSA-L1. Logo após a indução, analisamos os extratos protéicos solúvel e insolúvel destas células e o extrato protéico total das bactérias BL21(DE3)*pLysS* transformadas com o vetor pT7-7, como controle, também induzido nas mesmas condições. A figura 8 mostra o perfil eletroforético do extrato bruto das células BL21(DE3)*pLysS* transformadas com o vetor pT7-7 (linha 1) e o perfil protéico dos extratos celulares insolúvel (linha 2) e solúvel (linha 3) das bactérias BL21(DE3)*pLysS* transformadas com o plasmídeo pMSA-L1. Pode-se notar a presença de uma banda de aproximadamente 11kDa presente nas linhas 2 e 3 que não é visível na linha 1. Esta banda corresponde à superexpressão da proteína GlnZ de *A. brasilense* presente tanto na fração solúvel quanto na insolúvel do extrato celular. Tendo em vista a maior concentração da proteína GlnZ na fração solúvel do extrato celular, os resultados seguintes referem-se somente a este tipo de extrato.

Após a análise da solubilidade da proteína GlnZ, iniciamos os testes para obter suas condições ótimas de superexpressão nesta mesma estirpe de *E. coli*.

A proteína GlnZ foi superexpressa a partir do plasmídeo pMSA-L1 em BL21(DE3)*pLysS* com uma taxa de migração em gel de poliacrilamida 15% de aproximadamente 11kDa variando apenas a sua taxa de expressão uma vez que as condições de indução estavam sendo modificadas.

Na figura 9, podemos observar que a proteína GlnZ tem uma taxa de expressão bastante variada relacionada com o agente indutor e com a densidade óptica da cultura no momento inicial da indução. Todas as células foram induzidas por 4 horas. Quando induzida com IPTG (0,5mM), a proteína GlnZ apresenta uma superexpressão bastante similar tanto em D.O.₆₀₀ inicial de 0,3 (linha 1) quanto em 0,5 (linha 2). Entretanto, há uma quantidade maior de proteínas contaminantes em D.O.₆₀₀ inicial de 0,5. Com o agente indutor lactose, utilizado na concentração de 0,5% p/v, ocorre diferença de indução entre as bactérias induzidas com uma D.O.₆₀₀ inicial de 0,3 ou 0,5. A taxa de superexpressão da proteína GlnZ é visivelmente maior em D.O.₆₀₀ inicial de 0,5 (linhas 5 e 6) que quando a indução é iniciada em D.O.₆₀₀ 0,3 (linha 4). A concentração de contaminantes, da mesma forma que na indução com IPTG, é mais elevada na

densidade óptica de 0,5. Na linha 3, observamos o extrato protéico das células BL21(DE3)*pLysS* transformadas com o vetor pT7-7 que não possui a proteína GlnZ.

A partir destes resultados podemos concluir que a proteína GlnZ é superexpressa em *E. coli* BL21(DE3)*pLysS* tanto com lactose quanto com IPTG com boas taxas de indução.

Tendo estabelecido as melhores condições de superexpressão da proteína GlnZ, os protocolos para sua purificação poderão ser iniciados. Com a proteína GlnZ purificada, vários ensaios de interação com outras proteínas do metabolismo nitrogenado, assim como a produção de anticorpos policlonais, poderão ser realizados.

4.5.2. Expressão da proteína GlnZ de *A. brasilense* em *E. coli* RB9065 (DE3)

A estirpe de *E. coli* RB9065(DE3) é *glnB*⁻ e *glnD*⁻. A proteína GlnZ expressa nestas bactérias não pode ser uridililada pelo produto do gene *glnD* (a proteína GlnD ou uridililtransferase/enzima removedora de uridilil) e a ocorrência de híbridos com a proteína GlnB destes microrganismos é também bastante diminuída. A expressão de *glnZ* nestes microrganismos tem como principal objetivo obter a proteína GlnZ na maior homogeneidade possível, fator necessário para determinados ensaios, como por exemplo a cristalização.

Com esta estirpe foram realizados alguns testes apenas variando a D.O.₆₀₀ da culturas para iniciar a indução, uma vez que utilizou-se apenas IPTG 0,5mM como agente indutor durante 4 horas.

Na figura 10 pode-se observar que a proteína GlnZ teve uma maior taxa de expressão com uma D.O.₆₀₀ inicial de 0,2 (linha 1) se comparada com a superexpressão desta proteína iniciando-se a indução em D.O.₆₀₀ de 0,5.

Estes resultados indicam que a proteína GlnZ pode ser expressa na linhagem de *E. coli* RB9065(DE3) e que seu nível de expressão é alto suficiente para permitir uma possível purificação da proteína.




Figura 2: Produto de amplificação obtido do DNA genômico de *A. brasilense*.

Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5%, TAE 1X.

MW indica o padrão de massa molecular (100pb ladder).


As bandas indicadas nas linhas 1 e 2 apresentam cerca de 340 pb e correspondem ao fragmento amplificado a partir do DNA genômico de *A. brasilense* por PCR, o gene *glnZ*.

T7 promotor


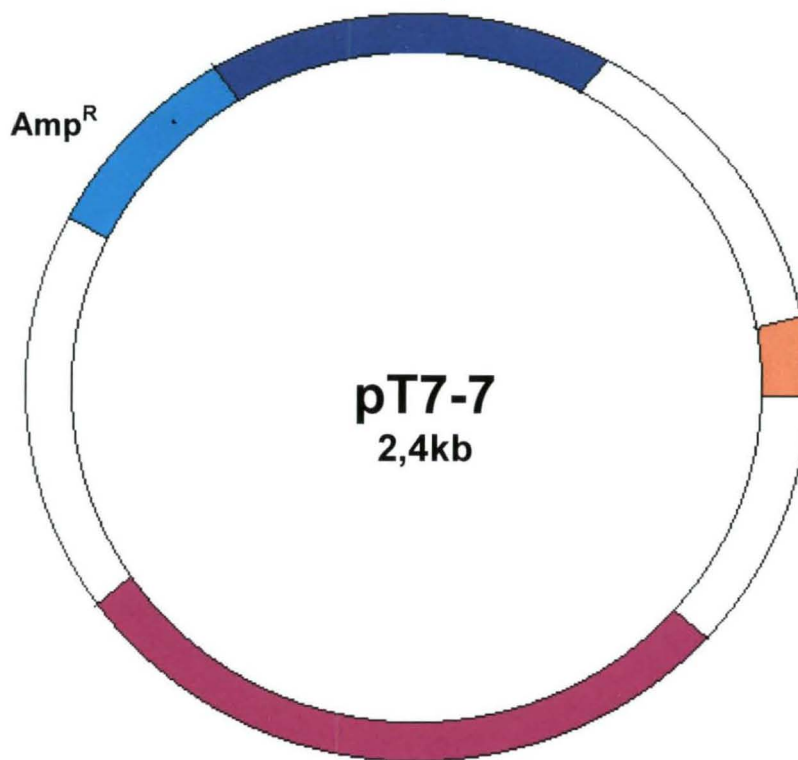
CGATTCGAACTTCTCGATTTTCTGAACTTCTGATAGACTTCGAAATTAATACGACTCACTATA

GGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAC
Xba

ATATGGCTAGAATTCGCGCCCGGGGATCCCTCTAGAGTCGACCTGCAGCCCAAGCTTATC
Nde *Bam*HI *Xba*


T7 terminador

Sítio de Policlonagem



Origem de Replicação

Figura 3: Esquema do vetor de expressão pT7-7

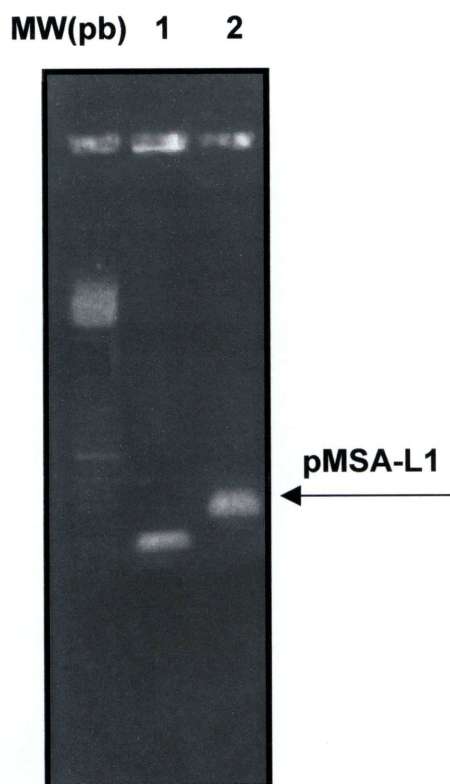


Figura 4: Análise do plasmídeo recombinante pMSA-L1

Eletroforese em gel de agarose 1,5%, TAE 1X.

MW indica o padrão de massa molecular (100pb ladder).

A existência do plasmídeo recombinante pMSA-L1 pode ser comprovada na medida em que foi possível observar diferença de migração das amplificações resultantes das reações de PCR que utilizaram como DNA molde o vetor pT7-7 (linha 1) e o plasmídeo purificado a partir das bactérias selecionadas no meio LA com ampicilina (linha 2). Os fragmentos provindos do plasmídeo recombinante possuem o tamanho correspondente ao esperado para o gene *glnZ*.

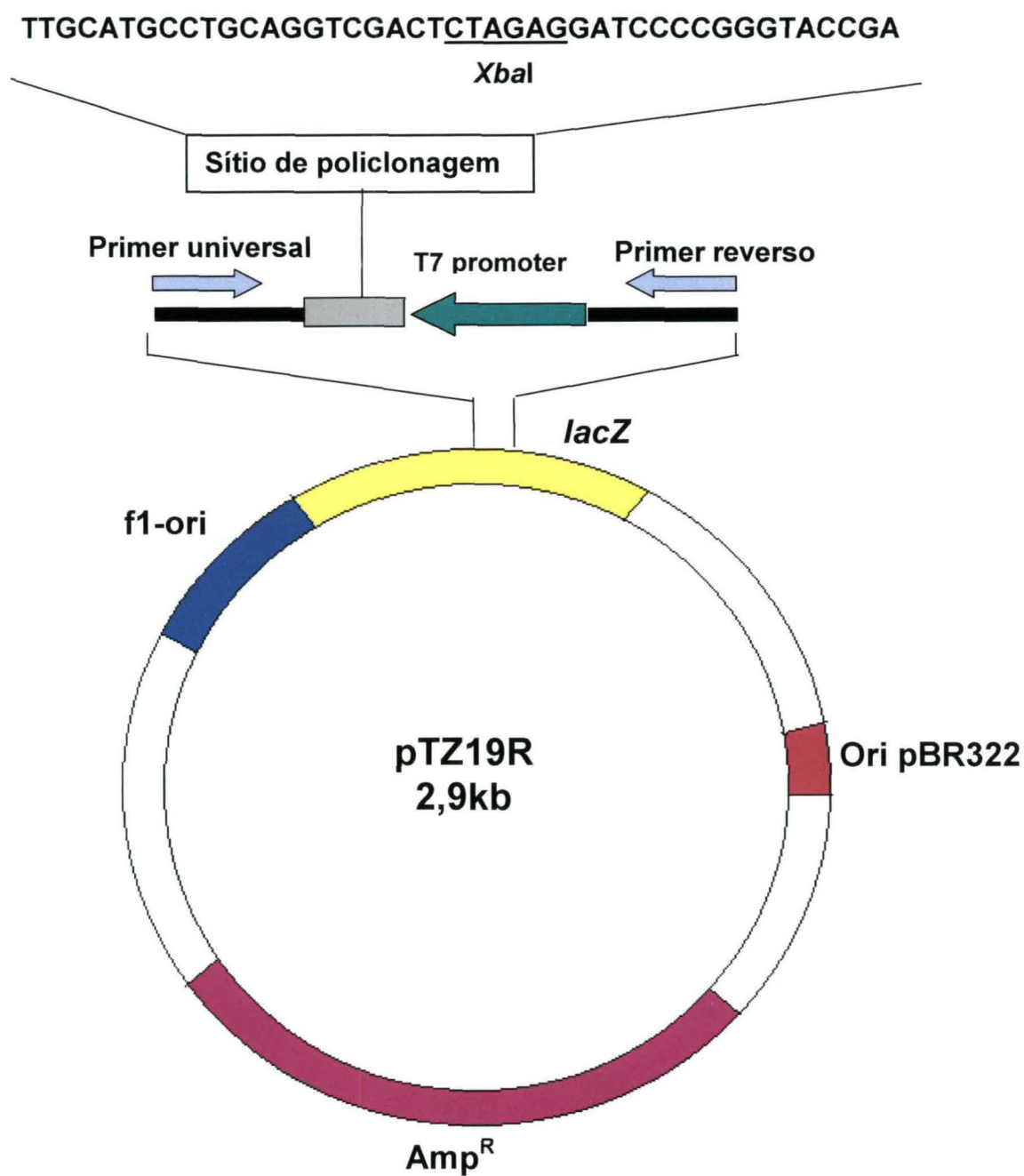


Figura 5: Esquema do vetor pTZ19R

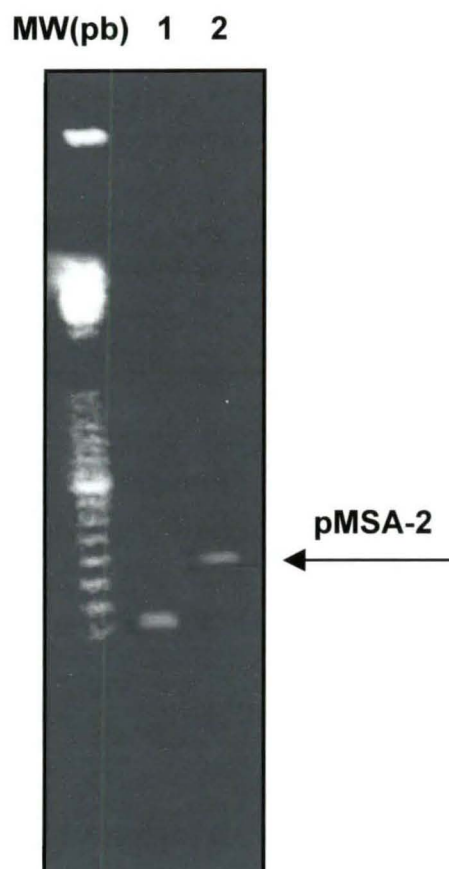


Figura 6: Análise do plasmídeo recombinante pMSA-2

Eletroforese em gel de agarose 1,5%, TAE 1X.

MW indica o padrão de massa molecular (100pb ladder).

A partir de reações de PCR foi possível confirmar a clonagem do gene *glnZ* de *A. brasilense*. O produto amplificado a partir do vetor pTZ19R (linha 1) apresenta aproximadamente 100pb, tamanho correspondente ao sítio de policlonagem deste vetor. Já o produto amplificado a partir do plasmídeo recombinante pMSA-2 possui cerca de 450 pb que é o tamanho esperado para a amplificação do gene *glnZ* mais algumas bases do sítio de policlonagem do vetor.


```

Query: 1      atgaaactgggttatggccatcatcaagccgttcaagctcgacgaagtgcgcgaggcgctg 60
            |
Sbjct: 1057 atgaaactgggttatggccatcatcaagccgttcaagctcgacgaagtgcgcgaggcgctg 1116

Query: 61     acgtcgctcgggattcagggcctgacggtgagcgagggtgaagggcttcggacgccagaag 120
            |
Sbjct: 1117 acgtcgctcgggattcagggcctgacggtgagcgagggtgaagggcttcggacgccagaag 1176

Query: 121    ggtcagaccgagatctaccgcggcgccgagattccgtgagcttcctgcccagggtgaag 180
            |
Sbjct: 1177 ggtcagaccgagatctaccgcggcgccgagattccgtgagcttcctgcccagggtgaag 1236

Query: 181    gtcgagggtcgcggtgtccgacgaccagtagcagcagggtggtcgaggcgatccagaaggcc 240
            |
Sbjct: 1237 gtcgagggtcgcggtgtccgacgaccagtagcagcagggtggtcgaggcgatccagaaggcc 1296

Query: 241    gccaacaccggccgcacatcggcgacggcaagatcttcgttcttgacatcgcccaggccgtg 300
            |
Sbjct: 1297 gccaacaccggccgcacatcggcgacggcaagatcttcgttcttgacatcgcccaggccgtg 1356

Query: 301    cgcacccgcacccggcgagaccaacaccgaagctctctga 339
            |
Sbjct: 1357 cgcacccgcacccggcgagaccaacaccgaagctctctga 1395

```

Figura 7: Comparação entre a sequência obtida do inserto presente nos plasmídeos recombinantes com a sequência do gene *glnZ* depositada no banco de dados GenBank

Após sequenciamento do inserto presente nos plasmídeos recombinantes pMSA-L1 e pMSA-2 com os “primers” de interesse, a análise de comparação da sequência obtida foi feita utilizando o programa BLAST Search (GenBank/NCBI) (Altschul *et al.*, 1990). “query” corresponde à sequência do inserto presente no pMSA-L1 e pMSA-2 e “sbjct” à sequência do gene *glnZ* depositada no banco de dados.

É possível observar 100% de identidade entre as sequências.

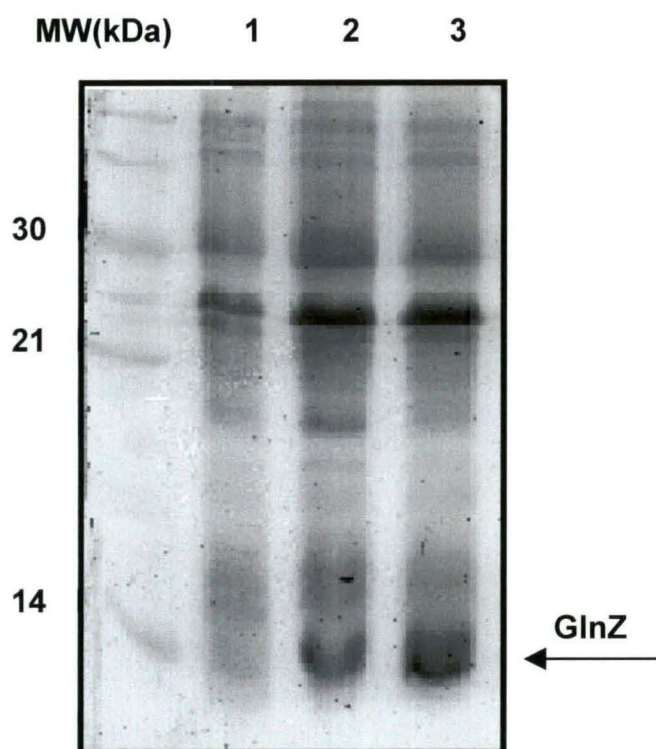


Figura 8: Teste de solubilidade da proteína GlnZ de *A. brasilense* em *E. coli* BL21(DE3)pLysS

Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS 15% utilizando padrão de massa molecular (MW).

Extratos de células BL21(DE3)pLysS transformadas com o vetor pT7-7 e com o plasmídeo pMSA-L1 foram analisados após indução com lactose, por 4 horas, segundo dados do próprio laboratório (Monteiro *et al*, 2000). A linha 1 mostra a fração total do lisado celular das células transformadas com o vetor pT7-7 e as linhas 2 e 3 mostram, respectivamente, a fração insolúvel e solúvel do lisado celular das células transformadas com o plasmídeo recombinante pMSA-L1.

As proteínas foram coradas com Coomassie-Blue.

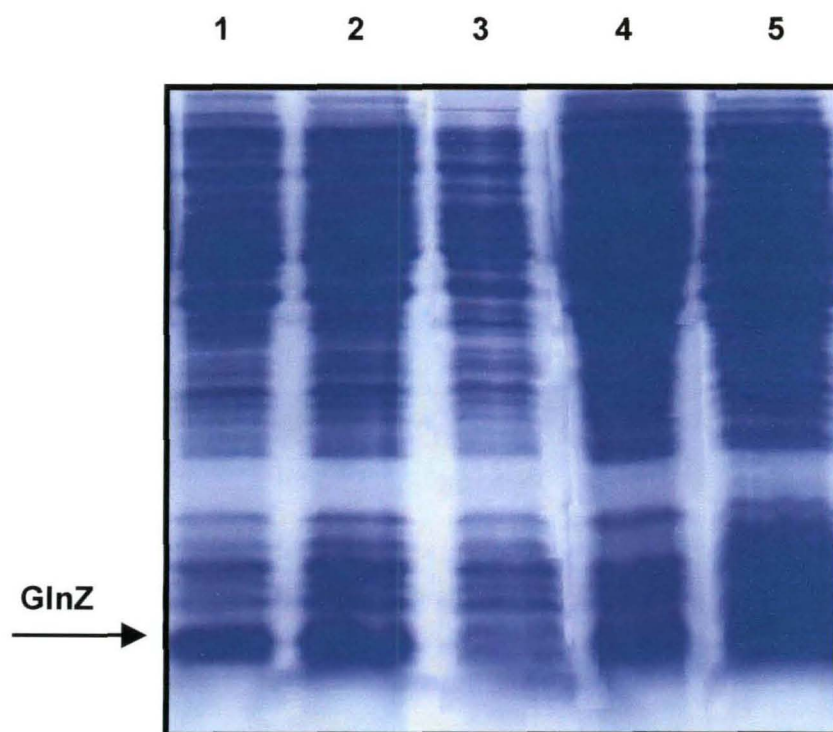


Figura 9: Expressão da proteína GlnZ de *A.brasilense* em *E. coli* BL21(DE3)pLysS a partir do plasmídeo recombinante pMSA-L1 – condições de indução

Gel de poliacrilamida-SDS 15%

Extratos protéicos das células BL21(DE3)pLysS transformadas com o vetor pT7-7 e com o plasmídeo pMSA-L1 foram analisados. Nas linhas 1 e 2 têm-se, respectivamente, o extrato protéico solúvel das células transformadas com o plasmídeo pMSA-L1, induzidas com IPTG na concentração de 0,5mM por 4 horas, com uma D. O₆₀₀ inicial de 0,3 (linha 1) ou 0,5 (linha 2).

Na linha 3 está mostrado o extrato protéico total das células transformadas com o vetor pT7-7. As linhas 4 e 5 mostram, respectivamente, o extrato protéico solúvel das células transformadas com o plasmídeo pMSA-L1 e induzidas com lactose por 4 horas partindo de uma D. O₆₀₀ inicial da cultura bacteriana de 0,3 e 0,5.

As proteínas foram coradas com Coomassie Blue.

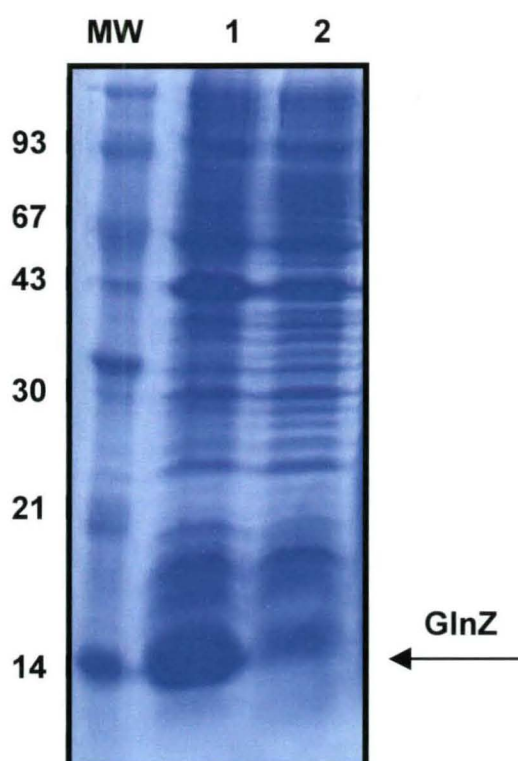


Figura 10: Expressão da proteína GlnZ de *A. brasilense* em *E. coli* RB9065 (DE3) a partir do plasmídeo recombinante pMSA-L1

Eletroforese SDS-PAGE 15%.

MW indica o padrão de massa molecular (em kDa).

As linhas 1 e 2 correspondem ao extrato protéico solúvel das células *E. coli* RB9065 (DE3) transformadas com o plasmídeo pMSA-L1 e induzidas com 0,5mM de IPTG por quatro horas variando a densidade óptica inicial de indução das culturas em 0,2 (linha 1) e 0,5 (linha 2).

As proteínas foram coradas com Coomassie Blue.

5. CONCLUSÕES

- O gene *glnZ* de *Azospirillum brasilense* foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico do microrganismo e oligonucleotídeos sintetizados quimicamente;
- O gene *glnZ* de *Azospirillum brasilense* foi clonado no vetor de expressão pT7-7, dando origem ao plasmídeo recombinante pMSA-L1, e no vetor pTZ19R originando o plasmídeo pMSA-2;
- O inserto presente nos plasmídeos recombinantes foi sequenciado e as sequências obtidas apresentaram 100% de identidade com a sequência do gene *glnZ* depositada no banco de dados GenBank;
- A proteína GlnZ de *Azospirillum brasilense* foi superexpressa a partir do plasmídeo recombinante pMSA-L1 em *E. coli* estirpes BL21(DE3)*pLysS* e RB9065 (DE3) e encontrava-se tanto na fração solúvel quanto na insolúvel dos extratos celulares;
- A proteína GlnZ superexpressa nestas duas estirpes apresentou uma taxa de migração em gel de poliacrilamida inferior a 14kDa, próximo portanto do teórico 11kDa;
- A proteína GlnZ de *A. brasilense* foi superexpressa tanto na estirpe BL21(DE3)*pLysS* quanto na RB9065 (DE3) de *Escherichia coli*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic. Acids Res.**, v. 25, p. 3389-3402, 1990
- ARSENE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. **J Bacteriol.**, Washington, v. 178, p.4830-4838, 1996.
- ATKINSON, M.R.; KAMBEROV, E.S.; WEISS, R.L.; NINFA, A.J. Reversible uridylylation of the *Escherichia coli* PII signal transduction protein regulates its ability to stimulate the dephosphorylation of the transcription factor nitrogen regulator I (NRI or NtrC). **J. Biol. Chem.**, 269, 28288-28293, 1994.
- ATKINSON, M., R.; NINFA, A. J. Role of the GlnK transduction protein in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli* . **Mol. Microbiol.**, v. 29(2), p. 431-447, 1998.
- BENELLI, E.M.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O. Evidence for two possible *glnB*-type genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J Bacteriol**, v. 179, p. 4623-4626, 1997.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BUENO, R.; PAHEL, G.; MAGASANIK, B. Role of *glnB* and *glnD* gene products in regulation of the *glnALG* operon of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, 164, 816-822, 1985.

- de MEL, V. S. J.; KAMBEROV, E. S.; MARTIN, P. D.; ZHANG, J.; NINFA, A. J.; EDWARDS, B. F. P. Preliminary X-ray diffraction analysis of crystals of the PII protein from *Escherichia coli*. **J. Mol. Biol.**, 1994
- de ZAMAROCZY, M.; ELMERICH, C. Regulatory roles of the structural homologues PII and PZ proteins in *Azospirillum brasilense*. In: 11th International congress on nitrogen fixation, Paris, France, p.12, 1997
- de ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; PELTRE, G.; FORCHHAMMER, K.; ELMERICH, C. Coexistence of two structurally similar but functionally different PII proteins in *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 178, p.4143-4149, 1996.
- DÖBEREINER, J. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. In BALLOWS, A., TRUPPER, H.G., DWORKING, M., HARDER, W. **The Prokaryotes**. 2.ed. vol III., p.2236-3353, Springer-Verlag, 1991
- DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbioses in tropical grasses characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In NEWTON, W. E. & NYMAN, C. J. eds. *Proc. of the 1st. Intl. Symp. Nitrogen Fixation*. v.2. Pullman, Washington Univ. Press. p.518-38, 1976.
- DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants. Science Tech Publishers/Springer-Verlag, 1987.
- KAMBEROV, E. S.; ATKINSON, M. R. J.; FENG, ; CHANDRAN, P.; NINFA, A. J. Sensory components controlling bacterial nitrogen assimilation. **Cell. Mol. Biol. Res.**, 40, 175-191, 1994.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. **Nature**, (Lond.), v. 227, p. 680-685, 1970.

- MEAD, D. A.; SZCZESNA-SKORUPA, E.; KEMPER, B. Single-strand DNA "blue" T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. **Protein Engineering**, Eynsham, v. 1, p. 67-74, 1986
- MERRICK, M. J. Regulation of nitrogen assimilation by bacteria. In COLE, J. A e FERGUSON, S. (eds.) **The nitrogen and sulphur cycles**. Cambridge, Cambridge Univ. Press. p.331-61, 1987.
- MERRICK, M. J. Regulation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic bacteria. In STACEY, G., BURRIS, R. H. & EVANS, H. J. (eds.) **Biological Nitrogen Fixation**. New York, Chapman and Hall. p.835-876, 1992.
- MERRICK, M. J. In a class of its own – the RNA polymerase sigma factor σ^{54} (σ^N). **Mol. Microbiol.** Oxford, 10, p. 903-909, 1993.
- MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiol. Rev.**, 59, 604-622, 1995.
- MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Use of lactose to induce expression of soluble NifA protein domains of *Herbaspirillum seropedicae* in *Escherichia coli*. **Can. J. Microbiol**, 46, 1087–1090, 2000.
- NINFA, A. J.; MAGASANIK, B. Covalent modification of the *glnG* product, NRI, by the *glnL* product, NRII, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 83, 5909-5913, 1986.
- PEDROSA, F.; YATES, G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr (gln)* type gene products. **FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc. Lett.**, Amesterdã, v. 23, p. 95-101, 1984

- PEDROSA, F. O. Physiology, biochemistry and genetics of *Azospirillum* and other root-associated nitrogen-fixing bacteria. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**, 6, 354-384, 1988.
- POSTGATE, J. R. **The fundamenals of nitrogen fixation**. Cambridge: Cambridge University Press,. 252p., 1982
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SON, H. S.; RHEE, S. G. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Purification and properties of PII protein and nucleotide sequence of its structural gene. **J. Biol. Chem.**, 262, 8690-8695, 1987.
- STADTMAN, E. R.; GINSBURG, A.; CIARDI, J. E.; YEH, J.; HENNING, S. B.; SHAPIRO, B. M. Multiple molecular forms of glutamine synthetase produced by enzyme catalyzed adenylation and deadenylation reactios. **Adv. Enzyme. Regul.** v. 8, p. 99-118, 1970.
- van HEESWIJK, W.; HOVING, S.; MOLENAR,D.; STEGEMAN, B.; KAHN, D.; WESTERHOFF, H. V. na alternative PII protein the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** v. 21, p. 133-146, 1996.
- YOUNG, J.P.W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: Stacey. G.; Burris, R.H.; Evans, H.J. (eds). **Biological Nitrogen Fixation**. London: Chapman & Hall, New York, p. 43-86, 1992